

200518861
NEW PATENT APPLICATION
DI01 Rec'd PCT/PTO 17 DEC 2004

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

Kenichiro Kosai, et al.

Application No.: New U.S. Patent Application

Filed: December 17th, 2004

Attorney Dkt. No.: 042-301

For: METHOD OF SELECTIVE ISOLATION OR VISUALIZATION OF
TARGET CELLS DIFFERENTIATED FROM EMBRYONIC STEM
CELLS OR KIT FOR VISUALIZATION

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

December 17th, 2004

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application, filed in the following foreign country is hereby requested for the above-identified patent application and the priority provided in 35 U.S.C. §119 is hereby claimed:

JAPANESE PATENT APPLICATION NO. JP2002-175231,
Filed June 17th, 2002.

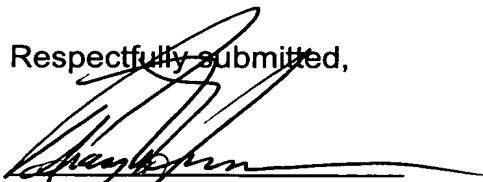
PCT PATENT APPLICATION NO. PCT/JP03/07536,
Filed June 13th, 2003.

In support of this claim, copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the requirements of 35 U.S.C. §119 have been fulfilled and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of these/this document(s).

Please charge any fee deficiency or credit any overpayment with respect to this paper to Apex Juris, pllc., Deposit Account No. 502069.

Respectfully submitted,



Tracy M Heims
Registration No. 53,010

APEX JURIS, pllc
13194 Edgewater Lane Northeast
Seattle, Washington 98125
Tel: 206-664-0314
Fax: 206-664-0329

0 / 518861

17 DEC 2004

PCT/JP03/07536

13 06.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

REC'D 01 AUG 2003

WIPO PAT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 6 月 1 7 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 1 7 5 2 3 1
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 1 7 5 2 3 1]

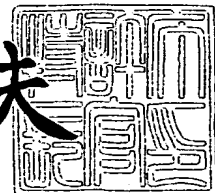
出 願 人 財 団 法 人 名 古 屋 産 業 科 学 研 究 所
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 7 月 1 1 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 3 - 3 0 5 6 6 8 9

BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 PTL09

【提出日】 平成14年 6月17日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 C12N 5/00
C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県岐阜市司町 4 0 番地岐阜大学医学部内

【氏名】 小財 健一郎

【発明者】

【住所又は居所】 岐阜県岐阜市司町 4 0 番地岐阜大学医学部内

【氏名】 高橋 知之

【特許出願人】

【識別番号】 598091860

【氏名又は名称】 財団法人名古屋産業科学研究所

【代理人】

【識別番号】 100109597

【弁理士】

【氏名又は名称】 西尾 章

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 069443

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法及びそれに用いる単離用キット

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に 5' 側から配置され、第 1 のプロモーターが前記選択マーカー遺伝子を発現させる第 1 の組換え DNA と、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第 2 のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に 5' から配置された第 2 の組換え DNA とを、各々胚性幹細胞に導入することを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 2】 リコンビナーゼ認識配列が、loxP である請求項 1 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 3】 第 1 のプロモーターが、恒常的強発現プロモーターである請求項 1 又は請求項 2 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 4】 恒常的強発現プロモーターが、CMV プロモーター又は CA プロモーターである請求項 3 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 5】 選択マーカー遺伝子が、蛍光蛋白遺伝子である請求項 1 ～請求項 4 のいずれかに記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 6】 リコンビナーゼ発現遺伝子が、リコンビナーゼ Cre 発現遺伝子である請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 7】 第 2 のプロモーターが、Nkx2.5 遺伝子プロモーター又は α MHC 遺伝子プロモーターである請求項 1 ～請求項 6 のいずれかに記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 8】 第 1 の組換え DNA の胚性幹細胞への導入が、第 1 の遺伝子導入用ベクターを用いて行われることを特徴とする請求項 1 ～請求項 7 のいずれかに記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 9】 第 1 の遺伝子導入用ベクターが、ウイルスベクターである請求項

8 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 10】 ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求項 9 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 11】 第 2 の組換え DNA の胚性幹細胞への導入が、第 2 の遺伝子導入用ベクターを用いて行われることを特徴とする請求項 1 ～請求項 10 のいずれかに記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 12】 第 2 の遺伝子導入用ベクターが、ウイルスベクターである請求項 11 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 13】 ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求項 12 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【請求項 14】 請求項 1 ～請求項 5 のいずれかに記載の第 1 の組換え DNA が導入されたことを特徴とする胚性幹細胞。

【請求項 15】 請求項 1、請求項 6、請求項 7 のいずれかに記載の第 2 の組換え DNA が導入されたことを特徴とする胚性幹細胞。

【請求項 16】 請求項 1 ～請求項 7 のいずれかに記載の第 1 の組換え DNA と第 2 の組換え DNA とが各々導入されたことを特徴とする胚性幹細胞。

【請求項 17】 胚性幹細胞が、マウスに由来することを特徴とする請求項 14 ～請求項 16 のいずれかに記載の胚性幹細胞。

【請求項 18】 請求項 8 ～請求項 10 のいずれかに記載の第 1 の遺伝子導入用ベクター。

【請求項 19】 請求項 11 ～請求項 13 のいずれかに記載の第 2 の遺伝子導入用ベクター。

【請求項 20】 請求項 18 記載の第 1 の遺伝子導入用ベクターと、請求項 19 記載の第 2 の遺伝子導入用ベクターと、を含むことを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法に用いる単離用キット。

【請求項 21】 請求項 14 記載の胚性幹細胞と、請求項 19 記載の第 2 の遺伝子導入用ベクターと、を含むことを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法に

用いる単離用キット。

【請求項 22】請求項 18 記載の第 1 の遺伝子導入用ベクターと、
請求項 15 記載の胚性幹細胞と、
を含むことを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法に
用いる単離用キット。

【請求項 23】請求項 1～請求項 13 のいずれかに記載の胚性幹細胞から分化
した目的細胞の選別的単離方法により得られることを特徴とする細胞。

【請求項 24】細胞が、第 2 のプロモーターとして Nkx2.5 遺伝子プロモーター
を用いて得られる細胞である請求項 23 記載の細胞。

【請求項 25】細胞が、第 2 のプロモーターとして α MHC 遺伝子プロモーター
を用いて得られる心筋細胞である請求項 23 記載の細胞。

【請求項 26】請求項 23～請求項 25 のいずれかに記載の細胞を含む組織。

【請求項 27】請求項 23～請求項 25 のいずれかに記載の細胞及び／又は請
求項 26 記載の組織を用いることを特徴とする疾患の治療法。

【請求項 28】疾患が、心疾患である請求項 27 記載の疾患の治療法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、胚性幹細胞から分化する目的細胞を選別的に単離する方法及びそれ
に用いる単離用キットに関する。

【0002】

【従来技術】

胚性幹 (Embryonic Stem、ES) 細胞 (以下、ES細胞ともいう) は、初期胚から
分離された細胞で、培養系を操作することにより血球系、心筋、骨格筋、神経な
どいかなる臓器、細胞にも分化し得る全能性を有するため、これを利用して発生
学などの生物学、先端医学の分野などでの研究の進展が大いに期待されている。

このような研究のためには、ES細胞から分化した目的細胞を効率良く、確実に
選別し、単離する方法の確立が最も重要な課題の一つである。

ところで、従来、分化した目的細胞が特異的な膜蛋白を発現する場合は、その

膜蛋白を指標にフローサイトメトリーで目的の細胞を単離することが行われている(守田陽平, リンパ球サブセットに対する多重染色解析: 中内啓光監修, 田中弥生編, フローサイトメトリー自由自在(細胞工学 別冊), 秀潤社, p60-66 (1999)/Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flkl-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. Nature 408(6808): p92-6. (2000))。

しかし、この方法が適応できるのは、細胞特異的な分子が膜蛋白として細胞外に発現している場合に限られるため、血球系や血管系などの一部の細胞、臓器に応用が限定されるのが実情であった。

【0003】

このため心筋細胞のように特異的な膜蛋白が知られていない多くの細胞に対する方策としては、目的の細胞に特異的に発現する分子(遺伝子)のプロモーター領域下にマーカー遺伝子をつないだ組換え遺伝子をES細胞に安定導入し、分化した細胞で特異的に発現するそのマーカーを指標に細胞を選別し、単離する方法が報告されている(Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Hescheler J, Fleischmann B, Arnhold S, Addicks K. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. Stem Cells 19(5):419-24 (2001))。この方法は、組織特異的に発現する遺伝子プロモーターを使うことにより、薬剤耐性遺伝子を細胞特異的に発現させてその薬剤を用いて目的細胞のみを選別する方法、あるいは特異的な波長の励起光で発色する分子を細胞特異的に発現させることによりフローサイトメトリーで目的の細胞を選別して単離する方法に関するものである。

【0004】

しかしながら、これらの方法は細胞特異的なプロモーターの活性(発現強度)に著しく左右されてしまうという大きな問題点があり、その応用と効用は非常に限定的であった。すなわち、細胞特異的なプロモーターは特異性はあっても活性が弱い場合、分化した目的細胞を選別、単離するために十分な強度のマーカー遺

伝子の発現が得られず目的細胞を選別できないため、この方法が適応できるものは非常に限定されるというのが実情であった。また、実験計画をする段階で確実にこの方法が有用であるか否かを予想することが困難で、予想される結果が不確かであるにも拘わらず目的細胞に分化させて単離するためにES細胞株を目的毎に1つ1つ作製し、分化した目的細胞の1つ1つについて検証をしなければならず、多大な労力と時間を使いながら結果として目的細胞を単離できないことがあった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記事情に鑑みなされたものであり、活性（発現強度）が低い組織特異的なプロモーターでもマーカー遺伝子を機能させるために十分な量の発現を可能とすることにより、各種動物のES細胞を用いた医学、生物学、バイオテクノロジー分野など様々な研究分野や再生医療において利用可能な分化した目的細胞を確実、簡便かつ迅速に選別単離する方法及びそれに用いる単離用キットを提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

恒常的強発現プロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に持つ遺伝子、マーカー遺伝子の順で5'側に配置した第1の組換えDNA、並びに組織特異的なプロモーター、リコンビナーゼ遺伝子の順で5'側に配置した第2の組換えDNAの2種類の組換えDNAをES細胞に導入し、ES細胞から分化した目的細胞を単離することに成功した。すなわちこの2つの組換えDNAが導入されたES細胞を目的の細胞に分化誘導させると、目的の細胞に分化した細胞でのみ第2の組換えDNAの組織特異的なプロモーターによりリコンビナーゼが発現し、比較的低レベルのリコンビナーゼの発現でも第1の組換えDNAのリコンビナーゼ認識配列で囲まれた遺伝子を切り出すのに十分であり、これにより目的の細胞でのみ恒常的強発現プロモーターによりマーカー遺伝子の発現が可能となり、この細胞を単離することができるということに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】

すなわち、本発明は、第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に5'側から配置され、第1のプロモーターが前記選択マーカー遺伝子を発現させる第1の組換えDNAと、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に5'から配置された第2の組換えDNAとを、各々胚性幹細胞に導入することを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法を要旨とする。

【0008】

上記発明において、第1の組換えDNA又は第2の組換えDNAの胚性幹細胞への導入を、遺伝子導入用ベクターを用いて行っても良い。遺伝子導入用ベクターとして、アデノウイルスベクターを用いることができる。

【0009】

また、本発明は、上記発明の第1の組換えDNA又は第2の組換えDNAが導入された胚性幹細胞を要旨とする。

【0010】

また、第1の組換えDNAが組み込まれた第1の遺伝子導入用ベクター又は第2の組換えDNAが組み込まれた第2の遺伝子導入用ベクターを要旨とする。

【0011】

また、第1の組換えDNAが組み込まれた第1の遺伝子導入用ベクターと第2の組換えDNAが組み込まれた第2の遺伝子導入用ベクターとを含むことを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法に用いる単離用キットを要旨とする。

【0012】

また、第1の組換えDNAが導入された胚性幹細胞と、第2の組換えDNAが組み込まれた第2の遺伝子導入用ベクターとを含むことを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法に用いる単離用キットを要旨とする。

【0013】

また、第1の組換えDNAが組み込まれた第1の遺伝子導入用ベクターと、第2の組換えDNAが導入された胚性幹細胞とを含むことを特徴とする胚性幹細胞

から分化した目的細胞の選別的単離方法に用いる単離用キットを要旨とする。

【0014】

また、上記の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法により得られることを特徴とする細胞又はこの細胞を含むことを特徴とする組織を要旨とする。

。

【0015】

また、上記の細胞及び／又は組織を用いることを特徴とする疾患の治療法を要旨とする。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的分離方法は、各種動物に由来するES細胞に適用ができ、例えばマウス、ラット、サル、ヒトなどすでに樹立されている種は勿論のこと、今後樹立されるであろう他の種のES細胞にも用いることが可能であり、ES細胞の動物種、種類により特に限定されるものではない。

ES細胞の取扱いの標準的な方法は、Brigid Hogan他著、山内一也他訳、「マウス胚の操作マニュアル」、近代出版（1997）、あるいは相沢慎一著、「ジントーゲッティング：ES細胞を用いた変異マウスの作製」、実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ8、羊土社（1995）などに記載されている。

【0017】

本発明に用いる第1の組換えDNAとは、第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子とが5'から順に配置されたものを遺伝子組換え技術により作製したものである。第1のプロモーターとは、選択マーカー遺伝子を十分に発現させられないような第2のプロモーターより活性が高く、選択マーカー遺伝子を発現させるに足るプロモーターであれば特に限定されるものではなく、例えばCA（サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ β アクチンプロモーターのハイブリッドプロモーター）プロモーターやCMV（サイトメガロウイルス初期遺伝子エンハンサー・プロモーター）プロモーターなどの恒常的強発現プロモーターが好適である。なお、恒常的強発現プロモーターとは、該プロモーターに繋いだ目的遺伝子

をES細胞を初めとするほとんどの細胞に導入した場合、目的の遺伝子を恒常的に強く発現させるプロモーターのことをいう。

【0018】

リコンビナーゼ認識配列は、特異的なDNA組換え酵素であるリコンビナーゼにより認識される塩基配列であり、そのリコンビナーゼにより二つのリコンビナーゼ認識配列で挟まれたDNA鎖の切断、置換、結合というDNAの組換え反応を生じる特異的な塩基配列をいう。

リコンビナーゼ発現遺伝子は、リコンビナーゼを発現する遺伝子で、loxPを認識するバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCre(Sternberg et al. J. Mol. Biol. Vol. 150, 467-486 (1981))、FRTを認識する酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由来のリコンビナーゼFLP(Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol. 260, 12313-12319 (1985))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR(Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol. 8, 955-962 (1988))を発現する遺伝子などを代表例として挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0019】

選択マーカー遺伝子は、第2の組換えDNAがES細胞に導入された後、第1のプロモーターにより発現しES細胞から分化した目的細胞を特異的に選別するための指標として用いるもので、EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) や GFP (Green Fluorescent Protein) などの発光蛋白遺伝子や種々の薬剤耐性遺伝子を挙げることができるが、選択マーカーとして用い得ればこれらに限定されない。特に、発光蛋白遺伝子は、目的細胞を可視化でき、フローサイトメトリーなどを用いてその選別単離が容易になるのでより好ましい。

【0020】

本発明に用いる第2の組換えDNAとは、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子が5'から順に配置されたものを遺伝子組換え技術により作製したものである。第2のプロモーターとは、分化する目的細胞でのみ特異的に発現する遺伝子プロモーター領域のことである。その例としては、心筋細胞のNkx2.5, MEF-2, GATA-4, 心筋型アクチン、心筋型 α ミオシン重鎖 (α -cardiac myosin heavy chain: 以下

、 α MHCという) 蛋白、ミオシン軽鎖2v(myosin light chain-2v: MLC2v)蛋白、脳の神経細胞のネスチンnestin、脳のグリア細胞のglial fibrillary acidic protein (GFAP)、より未分化な肝細胞の α フェトプロテイン α -fetoprotein (AFP)、(成熟した) 肝細胞のアルブミンalbumin、骨髄芽細胞のオステオカルシンosteocalcin、膵臓 β 細胞の膵・十二指腸ホメオボックス遺伝子pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1)、血管(内皮細胞)のflt-1、表皮ケラチン細胞のケラチン14keratin14 (K14)、骨格筋細胞の筋クレアチンキナーゼmuscle creatine kinaseなどの遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのプロモーターに繋がれたリコンビナーゼ発現遺伝子は、ES細胞がその目的細胞に分化したときに限定してリコンビナーゼを発現する。

【0021】

ES細胞への第1の組換えDNAあるいは第2の組換えDNAの導入には、それぞれの組換えDNAと共に薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドをエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポゾーム法、DAEデキストラン法などの分子生物学の一般的な方法で導入して、その後、薬剤添加培地で細胞を1-2週間培養することにより、染色体にこれらの組換えDNAが組み込まれ安定かつ永続的に遺伝子を発現するES細胞のクローンを採取して、分化の実験に用いることができる。さらに有用な方法として、第1の組換えDNAあるいは第2の組換えDNAを含む遺伝子導入用ベクターをそれぞれ作製し、これにより簡便かつ非常に効率的にES細胞に組換えDNAを導入することができる。遺伝子導入用ベクターの例としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノアソシエートベクター、センダイウイルスベクターなど、非ウイルスベクターとして、カチオニックリポゾーム、HVJリポゾームなどが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0022】

次に、本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法の原理を典型的な例を用いて図1を参照しながら説明する。第1の組換えDNAは、第1のプロモーター(図中、CAプロモーター)、リコンビナーゼ認識配列としてloxP配列、ES細胞から分化した目的細胞の選択マーカーとしてEGFP遺伝子が5'側から順

に配置され、2つのloxP配列間には、マーカーのNeo遺伝子とポリAシグナルが配置され、EGFP遺伝子の下流には、ポリAシグナルが配置されている。なお、リコンビナーゼ認識配列間に配置されるマーカーは、Neo遺伝子に限定されるものではなく、様々なマーカー遺伝子を用いることができる。また、ポリAシグナルも特に限定されず、牛成長ホルモンのポリAシグナル、ラビット β -グロビンポリAシグナルなど様々なポリAシグナルを用いることができる。

また、第2の組換えDNAは、第2のプロモーター（図中、Nkx2.5遺伝子プロモーター又は α MHC遺伝子プロモーター）、リコンビナーゼCreの順で5'側から配置されている。リコンビナーゼCreの下流には、ポリAシグナルが配置されている。

【0023】

第1の組換えDNAは、エレクトロポレーション法などを用いてES細胞に導入しても、あるいは第2の組換えDNAと共にアデノウイルスベクターなどの遺伝子導入用ベクターを用いてES細胞に導入しても良い。

【0024】

第1の組換えDNAと第2の組換えDNAが導入されたES細胞が、目的の細胞に分化誘導されることにより第2のプロモーターが発現し、リコンビナーゼCreが作用してloxP配列で囲まれた部分が切り出されると、第1のプロモーターによりEGFP遺伝子が強く発現し、蛍光を指標にして目的細胞の心筋細胞をフローサイトメトリーなどにより簡便かつ容易に選別単離することができる。

【0025】

【実施例】

次に、本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。なお、比較例、実施例のプラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う遺伝子工学技術ならびに細胞培養技術などは、特に断らない限り、「Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubelら編、(1994), John Wiley & Sons, Inc.」並びに「Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, R. Freshney編、第2版(1987), Wiley-Liss」に記載の方法に準じて行った。また特に断りが無い限り、ES細胞の培養、取り扱いに関しては前述のようにBrigid Hogan他著、山内一也他訳、「マウス胚の操作マニュアル

ル」、近代出版(1997)、あるいは相沢慎一著、「ジントーゲッティング:ES細胞を用いた変異マウスの作製」、実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ8、羊土社(1995)に記載の方法、アデノウイルスの一般的な取り扱いに関しては特に断りがない限り、Frank L. Graham著、Manipulation of adenovirus vectors, Chapter 11. p109-p128、; E.J. Murray編、Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols (1991)、アデノウイルスの作製については、Chen, S-H. et al., Combination gene therapy for liver metastases of colon carcinoma in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1995) 92, 2477-2581、あるいはMizuguchi et al, Human Gene Ther., Vol. 9, 2577-2583, (1998)に記載の方法に準じて行った。

【0026】

〔比較例〕

以下、従来の胚性幹細胞の単離方法を比較例として記載する。

Nkx2.5遺伝子プロモーターは、Yutzey氏より供与を受けたものを使用した。

Yutzeyらは、Nkx2.5遺伝子の5' 上流のゲノム解析により、Nkx2.5遺伝子の心筋特異的な発現調節を可能とするプロモーター領域について詳しい検討をおこなっている(詳細は、Development. Vol.125, 4461-4470 (1998)に記載)。これによると転写開始点より5' 上流の-3059bpまで含む領域が、Nkx2.5遺伝子の心筋特異的に十分な発現レベルで発現するための最適なプロモーター領域として働くことが確認されている。ちなみに、これより短い領域、つまり転写開始点より5' 上流-959bpまで、あるいは逆にこれより長い領域、つまり転写開始点より5' 上流-9000bpでも、心筋特異的に十分な発現レベルでこの下流の遺伝子を発現させることはできないことがこの論文で示されている。このNkx2.5遺伝子の転写開始点より5' 上流の-3059bpの領域、マーカー遺伝子の*lacZ*遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signalがプラスミドpBlueScript SKに挿入されたpNkx2.5-IA-LacZプラスミドをYutzey氏より供与を受けた(詳細は上記Development. Vol. 125, 4461-4470 (1998)に記載)。pNkx2.5-IA-LacZ(論文での記載名は-3059Nkx2.5lacZ)は心筋細胞特異的にLacZ遺伝子を発現することが確認されている。

【0027】

次いで、プラスミドのpEGFP-C1(クロンテック社、カタログ番号6084-1)から制限酵素のNheIとBclI処理によりEGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子を切り出し、切り出したEGFP遺伝子の両末端をT4 DNAポリメラーゼIにより平滑化した。pNkx2.5-IA-LacZを制限酵素のSalIで切断し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、自己ライゲーションを防ぐためCalf Intestine Phosphatase (CIP) 酵素で末端脱リン酸化処理した後、切り出したEGFP遺伝子とT4 DNAリガーゼで反応させライゲーション反応を行い、プラスミドpBS-Nkx2.5-EGFPを作製した。

【0028】

一方、プラスミドpBS-loxP-Neoは、プラスミドpBS246 (旧GIBCO BRL社、現インビトロジェン社、カタログ番号10348-019) のリコンビナーゼ認識配列のloxP配列2個の間のマルチクローニングサイト中のHindIII-BamHI間に、5' 側よりpGKプロモーター、Neo遺伝子 (G418薬剤耐性遺伝子)、bovine growth hormoneのpoly A signalの順で連結された遺伝子を挿入することにより作製した。このプラスミドpBS-loxP-Neoを制限酵素のNotIで切断しCIP処理を行い精製したものと、pBS-Nkx2.5-EGFPをNotIで切り出した遺伝子断片 (転写開始点から-3059までのNkx2.5プロモーター、EGFP遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signalが連結された遺伝子) とを、T4 DNAリガーゼで反応させ、pNkx2.5-EGFP-loxP-Neoを作製した。pNkx2.5-EGFP-loxP-Neoは、pBluescriptのバックボーンを持ち、5' 側よりNkx2.5遺伝子プロモーター (転写開始点から-3059まで)、EGFP遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signal、loxP配列、pGKプロモーター、Neo遺伝子、bovine growth hormoneのpoly A signal、loxP配列が順に挿入されたプラスミドである。

【0029】

このプラスミドpNkx2.5-EGFP-loxP-NeoをマウスES細胞株のR1細胞にエレクトロポレーション法 (バイオラド社のGene Pulser IIで、0.2mmのcuvetteで150mV、950 μ Fで通電) により遺伝子導入して、翌日より薬剤選択のための抗生剤のG418を150 μ g/mlの濃度でLIF (マウスleukemia inhibitory factorの組換え蛋白: 旧GIBCO BRL社、現インビトロジェン社、商品名ESGRO) 添加のES細胞用培地に加え、1-2週間後にコロニーが十分分離できたところで、この薬剤耐性のES細胞株

クローンをとった。3回の実験によりG418耐性のクローンを78個採取した。

尚、ES細胞用培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high glucose 条件, L-glutamine, 110mg/L sodium pyruvateが含有: シグマ社) に、NaHCO₃、125 μ M 2-mercaptoethanol (ナカライ社)、非必須アミノ酸 (インビトロゲン社)、核酸、20%胎児牛血清 (インビトロゲン社)、ストレプトマイシン、ペニシリンを加えたものである。なお、ES細胞の未分化能を維持する際はこのES細胞用培地に10³ U/mLでLIFを加えて培養し、ES細胞の分化誘導の際はこのES細胞用培地単独でLIFは添加しないで培養する。

【0030】

これらのクローンES細胞からDNAを抽出し、ゲノミックPCRを行い、EGFPを増幅するプライマーで25クローン陽性、連結されたNkx2.5遺伝子プロモーターとEGFPを含む領域を増幅するプライマーで16クローン陽性、さらにこの両者のプライマーセットでいずれも陽性だったものが13クローンであった。少なくともこの13クローンは正しく目的の遺伝子が導入されていると考えられるため、以降の実験にはダブルポジティブのこの13クローンを用いた。

【0031】

上記の13クローンのES細胞を2つの分化誘導系にのせた。一つの系はES細胞を細胞非接着の皿でLIF非添加のES細胞用培地で浮遊させて培養することにより、embryoid bodyと呼ばれる初期胚と似た細胞塊が形成された。このembryoid bodyを3日目 (LIFを除いた分化誘導開始から3日後) からまた接着の培養皿に移しLIF非添加のES細胞用培地で接着状態で培養すると、7日目 (LIFを除いた分化誘導開始から7日後) 位から14日目位にかけて、生体の心筋細胞のように自己拍動する細胞塊が出現してきた。

【0032】

もう一つの系はST2細胞というマウス間質細胞の上にES細胞をのせてLIF非添加のES細胞用培地で共培養する分化誘導系である。これもLIFを除いてこのST2細胞の上にES細胞をのせて7~9日後位より、生体の心筋のように自動収縮する細胞塊がところどころに出現してきた。

【0033】

この2つの分化系に載せて7日後から14日後までの各日の細胞塊からRNAを抽出し、RT-PCR法を行うと、心筋特異的な遺伝子 (Nkx2.5、 α MHC、MLC2vなど) の発現誘導が確認された。また同時期の細胞塊の免疫染色により筋特異的や心筋特異的な蛋白質 (α アクチニン、トロポミオシン、Nkx2.5、MLC2v) などの発現も確認でき、これらの自動収縮する細胞塊が心筋細胞に分化していることが証明された。

【0034】

一方、この4日後から14日後の心筋に分化した細胞塊から抽出したRNAからEGFP遺伝子のmRNAをRT-PCR法で増幅しても、いずれにおいても陽性の所見はみられなかった。そしてこれらのES細胞から分化した心筋細胞塊は、いずれのES細胞クローンから誘導されたものも、蛍光顕微鏡で可視化することも、またセルソーターで単離可能なレベルの明らかなEGFPの発現もみられなかった。前述のように、このNkx2.5遺伝子プロモーター(-3059)は、Yutzeyらが、Development, Vol.125, 4461-4470 (1998)で報告しているものと同様のものであり、このプロモーターに繋いだ遺伝子は、マウスの発生において早期より心臓の予定領域に発現し、心筋細胞に比較的特異的に発現することは確認されたものである。Yutzeyらが用いたLacZ遺伝子の発現を組織のx-gal染色で検出する方法は酵素反応であるため検出感度は比較的高く、検出に必要なLacZ遺伝子の発現レベルは非常に微量で良いが、細胞を生きたままで可視化、単離するためにはLacZ遺伝子はマーカー遺伝子として用いることができない。そのため、このような目的にはEGFP遺伝子をマーカー遺伝子として用いるのが一般的であるが、一方EGFPを蛍光顕微鏡で可視化させたりセルソーターで分離するためにはある程度のEGFP遺伝子の発現量が必要である。つまりこの遺伝子が正しく組み込まれて、またES細胞が心筋に分化したにも関わらずEGFPの発現がみられないのは、このNkx2.5遺伝子プロモーターに繋がれた遺伝子は心筋特異的な発現は生じて、EGFPを可視化できるレベルの発現活性を持たないためである。このように、従来法では目的の細胞に分化した心筋細胞をNkx2.5遺伝子プロモーターからEGFP遺伝子を発現させることで、可視化し、またセルソーターで単離するという試みは、いずれも不可能であった。

【0035】

【実施例 1】

5' 側より、CMVプロモーター(human cytomegalovirus immediate early promoter)あるいはCAプロモーター (cytomegalovirus enhancer+chicken β -actin promoter)、その下流に2つのloxP配列で囲まれたNeo遺伝子、さらにその下流のマーカー遺伝子にEGFP遺伝子を配置した第1の組換えDNAを含むプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPならびにpCA-loxP-Neo-EGFPを作製したが、その作製過程を以下に記載する。

【0036】

まずpcDNA3プラスミド(インビトロジェン社)を制限酵素のBclIとBsmIで処理してNeo遺伝子を切り出し、その断端をT4 DNAポリメラーゼI処理により平滑末端化する(インサート)。pBS246プラスミド(旧GIBCO BRL社、現インビトロジェン社)を制限酵素のHindIIIとBamHIで切断しCIP処理する(ベクター)。このインサートとベクターの両者をT4 DNAリガーゼで反応させライゲーションすることで、pBS246のloxP配列の間にneo遺伝子が挿入されたプラスミドのpBS-loxP-Neoを得た。

【0037】

次に、このpBS-loxP-Neoを制限酵素NotIで切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで処理し、2つのloxP配列とそれに囲まれたNeo遺伝子の遺伝子断片を回収した(インサート)。一方、プラスミドpIRES-EGFP(クロンテック社、カタログ番号#6064-7)を制限酵素ClaIとBamHIで処理し、MCS(マルチクローニングサイト)、IVS(synthetic intron)、IRES (internal ribosome entry site)を除いたベクター部分を回収し、これをT4 DNAポリメラーゼIで末端平滑化した(ベクター)。このインサートとベクターの両者をT4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、目的の一つのプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPを得た。

【0038】

さらにプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPをBglIIとEcoRIで処理しCMVプロモーター一部を除き、T4 DNAポリメラーゼIで断端を平滑末端化、CIP処理をした(ベクター)。一方、コスミドpAdex1Cawt(タカラ社、コード番号6150)をPmeIとSwaIで処理して、CAプロモーター部を切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで断端を平滑末

端化した（インサート）。このインサートと前記ベクターの両者をT4 DNAリガーゼで反応させライゲーションを行い、もう一つの目的プラスミドpCA-loxP-Neo-E GFPを得た。

【0039】

プラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPあるいはpCA-loxP-Neo-EGFPを別々にES細胞（D3細胞）にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、150 μ g/mL G418と 10³ U/L LIF添加したES細胞用培地にて1-2週間培養することにより、ES細胞クローンを単離した。これらの手技は比較例の項で詳細に記載した通りである。pCMV-loxP-Neo-EGFPを遺伝子導入したクローンを70個、pCA-loxP-Neo-EGFPを59個採取した。

【0040】

また、5'側より、Nkx2.5プロモーター(-3059)、リコンビナーゼのCre遺伝子、bovine growth hormone poly A signalを配置した第2の組換えDNAを作製し、さらにその遺伝子を含むアデノウイルスベクターAd.Nkx2.5-Creを下記のように作製した。

【0041】

まずプラスミドpHMCMV6（Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載、現在、クロンテック社より販売）をNheIとMunIで処理してCMVプロモーターを除いた後にT4 DNAリガーゼでライゲーションを行った。さらにこのプラスミドをAflIIIで切断しT4 DNAポリメラーゼIで断端の平滑末端化をおこない（ベクター）、この場所にプラスミドpBS185（旧GIBCO BRL社、現インビトロジェン社）よりXhoIとMluIでCre遺伝子を切り出してT4 DNAポリメラーゼIで平滑末端化したインサートを、T4 DNAリガーゼでライゲーション反応をおこない挿入し、プラスミドpHMΔp-Creを得た。つまりpHMΔp-Creは、プロモーターを持たず、任意のプロモーターを簡単に挿入するためのマルチクローニングサイトを持ち、その下流にCre遺伝子、bovine growth hormone poly A signalを持つプラスミドである。

【0042】

比較例で記載したpNXK2.5-IA-LacZをNotIとXbaIで切り出しT4 DNAポリメラー

で平滑末端化したNkx2.5遺伝子プロモーター部分（インサート）を、pHMΔp-CreをNotIで切断しT4 DNAポリメラーゼIで平滑末端化しCIP 処理したベクターに、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、プラスミドpHM-Nkx2.5-Creを得た。

【0043】

さらにpHM-Nkx2.5-CreをI-CeuI、PI-SceIで切断したインサート、ならびにアデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4（Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載）をI-CeuI、PI-SceIで切断したベクターを、T4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、アデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4-Nkx2.5-Creを得た。pAdHM4-Nkx2.5-CreをPacIで切断し精製したものを293細胞に遺伝子導入し、10-14日後に出現したアデノウイルスAd.Nkx2.5-Creのプラークを回収し、これを293細胞でウイルスの増幅をおこない、CsClの密度勾配法による精製、カラムによる脱塩を行った（方法の詳細は最初に記載した引用文献、著書に記載）。このAd.Nkx2.5-Creはヒト5型アデノウイルスベクターで、細胞に感染、遺伝子導入後はNkx2.5遺伝子プロモーターの制御下にCre遺伝子を発現する。

【0044】

また同様の方法でpHMΔp-CreにCAプロモーターを挿入して、同様の方法でアデノウイルスベクターAd.CA-Creを作製した。Ad.CA-Creはヒト5型アデノウイルスベクターで、細胞に感染、遺伝子導入後はCAプロモーターの制御下にCre遺伝子を発現する。CAプロモーターはES細胞を含むほとんどの細胞で、下流の遺伝子を恒常的に強く発現させることができるため、Ad.CA-Creを感染させた細胞はその分化状態に関わらず細胞内で恒常的にCre酵素を発現する。

【0045】

次に、アデノウイルスベクターのES細胞に対する遺伝子導入効率を調べた。このためまずCMVプロモーターの制御下にLacZ遺伝子を発現するヒト5型アデノウイルスベクターAd.CMV-lacZを前述の方法で作製した。Ad.CMV-LacZを各MOI（multiplicity of infection；感染可能なウイルス数／細胞数）で感染させ、x-gal染色で陽性細胞の割合を評価したところ、MOIを上げるに従い遺伝子導入効率は上昇した（図2参照）。そしてR1、D3のいずれのES細胞でも、またフィーダー細胞

有り、無しのいずれの状態でも、30 MOIでも多くの細胞に遺伝子が導入でき、100から300 MOIで100%のES細胞に遺伝子を導入することができた。しかし、余りにも極端にMOIを上げすぎると細胞障害がみられることもあるため、細胞障害がほとんどみられずに約60-80%の細胞に遺伝子導入ができる30 MOIで後述する実験を行った。同様に前述の分化誘導をかけたES細胞に十分量のAd. CMV-LacZを感染させてx-gal染色で評価すると、いずれの分化段階でも、分化誘導後1-14日目のいずれの日でも、大差なく大部分の細胞に遺伝子を導入することができた(図2c参照)。このようにアデノウイルスベクターを使うことで、ES細胞に簡単に高率にいずれの分化段階でも遺伝子を導入することが確認できた。特に分化誘導中はエレクトロポレーション法などの従来の一般的な遺伝子導入法では遺伝子導入することが困難であるため、アデノウイルスベクターの使用は非常に有用であることが分かった。

【0046】

第1の組換えDNAが組み込まれたpCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入されたES細胞の70クローンのうち、まず34個をEGFPを増幅するプライマーセットによるゲノミックPCRを行ったところ、そのうちの31個が陽性であった。またこの31個のES細胞クローンにAd. CA-Creを感染させたところ、4クローンが蛍光顕微鏡による観察で十分な発現強度をもって可視化された(この4クローンはいずれもEGFPのゲノミックPCRで陽性)。つまりゲノミックPCRでEGFP遺伝子の挿入を確認せずとも、直接Ad. CA-Cre感染でスクリーニングする方が、より発現の強いクローンを迅速に選別できるため、以降は得られたES細胞クローンは直接Ad. CA-Cre感染によるEGFPの発現強度により、目的のクローンを選別することにした。pCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入された残りの34クローンをAd. CA-Cre感染後の(蛍光顕微鏡での観察による)EGFP発現強度でスクリーニングしたところ、11クローンがEGFP強発現、4クローンがEGFP弱発現であった。つまり、pCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入された合計70クローンから15クローン(弱い発現もいれると19クローン)の目的のものを採取できた。

一方、pCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入された59クローンのES細胞を、Ad. CA-Cre感染後のEGFP発現で直接スクリーニングしたところ、16クローンがEGFP強発現す

る目的のものであった。

【0047】

pCMV-loxP-Neo-EGFPとpCA-loxP-Neo-EGFPがそれぞれ安定導入されたES細胞は、いずれもAd.CA-Creを感染しない場合、あるいはCre遺伝子を発現しないコントロールのAd.CMV-LacZの感染をした場合、EGFPの可視レベルの発現はなく問題となるバックグラウンドはなかった。またAd.CA-Creを感染させた後のpCMV-loxP-Neo-EGFPとpCA-loxP-Neo-EGFPがそれぞれ安定導入されたES細胞のEGFPの発現レベルは、いずれにおいてもpCA-loxP-Neo-EGFPの方が強かった。これは多くの細胞株で報告されてきたのと同様に、ES細胞においてもCMVプロモーターよりCAプロモーターの方が強発現を誘導できるという、それぞれのプロモーター活性の違いによると思われる。しかしpCMV-loxP-Neo-EGFPが導入されたES細胞でも可視レベルのEGFPの発現が得られ、さらに感度が高いセルソーターでの解析と単離を目的とした実験にはpCMV-loxP-Neo-EGFPでも本質的には問題ないと考えられる。本実験例での以下の分化誘導の実験には、より発現が強く蛍光顕微鏡下での観察がより明確に解析がより容易に行えるという点で、pCA-loxP-Neo-EGFPを用いて行った。

【0048】

前述のように、pCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入されCre酵素の発現後にloxPで挟まれたNeo遺伝子が切り出されてEGFPの強発現が保証された15クローンのES細胞のうち、3個のクローンを用いてAd.Nkx2.5-Creを用いた分化誘導の実験を行った。前述のAd.CA-Creを用いた予備実験で、Ad.CA-Cre感染1日後より十分に可視化されるレベルのEGFPの発現がみられ、感染2日後で最大の発現レベルに達し、それ以降同レベルのEGFPの持続発現が得られることが確認された。

【0049】

比較例で既に述べた、embryoid bodyを介した分化誘導系にこの3クローンのES細胞を使用してみた。まず、この分化誘導系でのNkx2.5 mRNAの発現をRT-PCRで毎日調べたところ、分化誘導5日目よりNkx2.5の発現が明らかにみられた。このため分化誘導後4日目に分化中のES細胞にAd.Nkx2.5-Creを30 MOIで感染させた。つまり、1日にLIF非添加のES細胞用培地で培養し非接着状態でembryoid bod

yの作製を初め、分化誘導開始後3日目に培養皿に接着させ、4日目にAd.Nkx2.5-Creを30 MOIで感染させた。分化誘導開始後5日目より蛍光顕微鏡下で所々にEGFPが可視化できる細胞が出現し、分化誘導開始後6日目より蛍光顕微鏡下で非常に強い発現レベルのEGFP発現が観察され、このEGFPの発現は以降もずっと見られた(図3c参照)。6日目、あるいは8日目でトリプシンにより細胞塊をばらばらにし、一個ずつの細胞に十分分離した後、セルソーターにてEGFPを発現する目的細胞を単離した。このフローサイトメトリーの解析では、Ad.Nkx2.5-Creを感染させた群の陽性率、つまりNkx2.5発現細胞は約2%であった(図4a参照)。一方これに対し、陽性コントロールとしてAd.Nkx2.5-Creの代わりにAd.CA-Creを感染させた群での陽性率は(則ちこれはアデノウイルスが感染しCre遺伝子を導入した細胞の割合を表すものであるが)、約60%であった。また一方陰性コントロールとしてAd.Nkx2.5-Creの代わりにAd.CMV-LacZを感染させた群、あるいはアデノウイルスベクターを全く感染させなかった群での陽性率は(則ちこれはpCA-loxP-Neo-EGFPの遺伝子が安定導入されているES細胞での、Cre酵素によるloxPが切りだされていない状態でのEGFP発現の漏れ、バックグラウンド)は0-0.2%であった(図3a、図4a参照)。すなわちこの実験系では、非常に高率に約60%の細胞に正しく目的の遺伝子が導入されており、またバックグラウンドがなく、正しく目的のNkx2.5発現細胞を可視化し、さらに単離できるということで、従来不可能だったこれらの技術を解決した非常にすぐれた実験系であることが分かった。

【0050】

次いで、単離された細胞はすぐに培養皿に蒔いて培養し、翌日、あるいは数日後にその細胞の性格、形質について解析を行った。まず単離された細胞のEGFP遺伝子の発現は、翌日から数日後も、大部分の細胞において蛍光顕微鏡ではっきりと確認できるくらいの強いEGFPの発現を示していた。これにより、この方法で単離された細胞が非常に高純度で目的の細胞であることが分かった。次に細胞の性格、形質の解析のため、この細胞からRNAを抽出しRT-PCR法により、Nkx2.5遺伝子の発現、心筋特異的な分子、並びにその他関連の遺伝子の発現を調べた。あるいは、これらの単離細胞の免疫細胞染色を行い、これらの分子の発現を調べた。

まずNkx2.5遺伝子、 α MHC、MEF2c(心筋特異的転写因子)、GATA4(心筋に頻

度が高く発現する転写因子)は、80%の細胞で明らかな発現がみられた。この結果よりこの細胞の多くは心筋細胞であることが分かった。一方、20-30%の細胞に、心筋以外のマーカーの平滑筋型アクチン (smooth muscle actin: SMA)、トロポミオシン (tropomyosin) の発現もみられた (図 4 b 参照)。ES細胞からNkx2.5を発現する細胞のみを確実に (しかも蛍光顕微鏡でも可視化できるレベルで確実に) 単離できた報告はこれまでになく、Nkx2.5は現在まで分かっている心筋特異的遺伝子の中で心筋の発生過程で最も早期に発現する転写因子であることを考えると、本細胞の一部が心筋以外のマーカーを発現するという結果は、本細胞が今までにES細胞から単離されたことのない、成熟心筋細胞以前の分化段階の心筋細胞、さらには心筋芽細胞とでもいうべき心筋への分化が運命付けられているより未分化な細胞の可能性もある。そのため、この単離された細胞自身が、特に未だ十分に解明されていない初期の心臓の発生や、分化、再生に関する今後の基礎研究、さらにES細胞を使った心疾患への再生医療法開発にいて非常に有用なものと考えられる。

また、心筋の各分化段階で発現する様々な心筋特異的遺伝子はMEF2CやGATA4など幾つか報告されており、今後本方法を用いることでこのような遺伝子の発現を指標に心筋の各分化段階の細胞を自由に単離することが可能であり、本法の発明の意義は大きい。さらに本法の有用性は心筋に限定されるものではなく、組織特異的、あるいは性格が同定された種々遺伝子のプロモーターを用いれば、ES細胞から分化するいかなる特異的な分化段階の各組織も、ある遺伝子の発現に特化したいかなる目的の細胞も可視化でき、単離することが可能である。この点から、本発明は、ES細胞を用いた再生医学、発生学において極めて重要な意義を持つものである。

【0051】

〔実施例2〕

本発明に用いる第2のプロモーターは、Nkx2.5遺伝子プロモーターに限られるものではなく、その他の心筋特異的遺伝子を指標にしたES細胞由来の心筋細胞、あるいはES細胞由来の他の細胞や組織を、蛍光顕微鏡下での可視化し、さらに単離する目的に、一般化でき広く用いることが可能である。つまり第2のプロモ-

ターさえ目的のものに置換する事で、いかなるES細胞由来の目的細胞をも可視化し、単離できる。このような本発明の広い一般的な有用性をさらに確認するために、第2のプロモーターにマウスの α MHC遺伝子プロモーターを用いたアデノウイルスベクターAd. α MHC-Cre、つまりこれは α MHCが発現する心筋細胞に特異的にCre酵素を発現するような組換え遺伝子を導入するアデノウイルスベクターであるが、これを実施例1と同様の方法で作成して同様の実験を行った。

【0052】

Ad. α MHC-Creは以下のようにして作製した。まずシンシナチー医科大学 (University of Cincinnati, College of Medicine) のJeffrey Robbins氏より供与された、 α MHCプロモーターが挿入されているプラスミド (プラスミドの詳細は、J. Biol. Chem. Vol. 266, p9180-9185 (1991)に記載) から、BamHIとSalIで α MHC遺伝子プロモーターを含む約5.5kbのDNAを切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、精製、抽出した。これはRobbins氏らが上記文献で報告しているように、心臓型 β ミオシン重鎖遺伝子の3'側の最後のエクソンの一部、 α MHCの3'領域ならびに蛋白をコードしない最初の三つのエクソンを含むDNAであり、この領域が心臓特異的な発現をもたらすプロモーターとして働くことが同論文で示されている。一方実施例1で作成したベクターのpHM Δ p-CreをNotI酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、CIP酵素で末端脱リン酸化処理して精製した。これを前述の α MHC遺伝子プロモーターの5.5kbのDNA断片とともに、T4 DNAリガーゼ酵素で反応させライゲーション反応を行い、 α MHC遺伝子プロモーターの下流にCre遺伝子が繋がれたプラスミッドpHM- α MHC-Creを作成した。このpHM- α MHC-CreとアデノウイルスベクタープラスミッドpAdHM4を実施例1に記載したように、制限酵素のI-CeuI、PI-SceIで切断した後、両プラスミドをT4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、pAdHM4- α MHC-Creを得た。pAdHM4- α MHC-CreをPacIで切断し精製したものを293細胞に遺伝子導入し、10-14日後に出現したアデノウイルスAd. α MHC-Creのプラークを回収し、実施例1に記載したのと同様にウイルス増幅、精製、脱塩をおこなった。このように作成されたAd. α MHC-Creは、細胞に感染、遺伝子導入後は、 α MHC遺伝子プロモーターの制御下にCre遺伝子が発現するものである。

【0053】

実施例1で作成したpCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入されたES細胞クローン株の中で、Creの発現後にEGFPが強く発現することが確認された実施例1で用いたのと同じES細胞クローン株を用いて、Ad.Nkx2.5-Creの代わりにAd. α MHC-Creを用いて実施例1と同様の実験をおこなった。基本的な実験プロトコール、手技は実施例1に記載したのと同じであるが、ただ実施例1では、Ad.Nkx2.5-Creを分化誘導後4日目に感染させて6日目に可視化された目的細胞をセルソーターで単離させていたところを、本実施例ではAd. α MHC-Creを9日目に感染させて13日目に可視化された目的細胞をセルソーターで単離することにした。これは分化誘導開始後のES細胞の内因性の α MHC遺伝子の発現をRT-PCR法や免疫組織化学で調べたところ、 α MHCの発現は約8日目から14日目にかけて顕著にみられたためである。ES細胞の分化におけるこの α MHCの発現時期の結果は、 α MHCは心筋特異的収縮蛋白の一つであるため成熟した心筋細胞で発現が強くみられるという生体内での事実と一致するものであり、また心筋様の拍動を示すES細胞のコロニーも分化誘導後9-14日目に最も顕著にみられるということもこれと合致する所見である。このようにAd. α MHC-Creの感染の時期以外の点では、実施例1と全く同じように実験を行った。

【0054】

Ad. α MHC-Cre感染後1日目（分化誘導後9日目）より、一部の細胞にEGFPの発現が蛍光顕微鏡下で認められ、感染後2日目（分化誘導後10日目）からはっきりとし、それ以降発現はやや増強し、感染後4日目（分化誘導後13日目）にはEGFPの発現は最大となったため、この時にトリプシンで細胞をばらばらにし、セルソーターでEGFP陽性細胞を単離した（図3d参照）。単離された細胞はほとんどEGFPを発現していた。さらにこれらの細胞の特性を確認するために、RT-PCRと免疫染色により、 α MHC、アクチニンなどの心筋特異的分子のmRNAと蛋白の発現を調べたところ、単離されたほとんどの細胞でこれらの心筋特異的分子の発現は陽性であった（図4c参照）。またさらに電子顕微鏡の観察で横紋筋繊維構造などの心筋細胞に特有な細胞構造も確認できた。そして何といても、培養皿に接着させて培養して翌日から数日間、細胞の心筋様の拍動が観察されたことは、単離された

細胞が目的の成熟した心筋細胞であることを示している。これらの結果より、単離された細胞は成熟した心筋細胞であることが確証できた。このように本法により、Nkx2.5は転写因子で α MHCは収縮蛋白というように、二つの性格の異なる遺伝子のプロモーターを用いて、実施例1で比較的未熟な分化段階の心筋細胞を、そして実施例2で成熟した心筋細胞を、確実に単離できたことから、本発明が広く一般化して用いられ、有用であることが確証された。

【0055】

〔実施例3〕

実施例1では第1の組換えDNAが安定導入できたES細胞クローンを最初に取り、そのES細胞に分化誘導過程で第2の組換えDNAをアデノウイルスベクターにより遺伝子導入するという方法を用いたが、実施例3ではES細胞クローンを取るといった作業をすることなしに、第1の組換えDNAも第2の組換えDNAも分化誘導過程のES細胞にアデノウイルスベクターを使って直接遺伝子導入した。

このためまず、第1の組換えDNAを遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを以下のように作製した。

【0056】

まず実施例1で作成したpCA-loxP-Neo-EGFP、pCMV-loxP-Neo-EGFPからSalI酵素処理により、5'側よりCAプロモーター、リコンビナーゼ認識配列のloxP配列で囲まれたneo遺伝子、ポリA配列、EGFP遺伝子、ポリA配列が繋がった目的のDNA断片を切り出した。一方、アデノウイルスを作製するシャトルベクターのpHM5プラスミド (Mark Kay氏より供与: プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載) は、マルチクローニングサイトのSalI認識配列をSalI酵素で切断し、CIP酵素で末端脱リン酸化処理し、これと上記の切り出された目的のDNA断片とを、T4 DNAリガーゼ酵素でライゲーションすることにより、目的の第1の組換えDNAが挿入されたシャトルベクタープラスミッドpHM-CA-loxP-Neo-EGFP、pHM-pCMV-loxP-Neo-EGFPを得た。さらに、このpHM-CA-loxP-Neo-EGFP、pHM-pCMV-loxP-Neo-EGFPからI-CeuI、PI-SceI酵素で目的の遺伝子部分を切り出し、実施例1でも述べたように、I-CeuI、PI-SceI酵素処理されたアデノウイルスベクタープラスミッドのpAdHM4とともに、T4 DNA

リガーゼでライゲーションすることで、目的の第1の組換えDNAを持つアデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4-CA-loxP-Neo-EGFP、pAdHM4-pCMV-loxP-Neo-EGFPを作製した。

【0057】

アデノウイルスベクターの作成は実施例1で述べたように行った。つまり、pAdHM4-CA-loxP-Neo-EGFP、pAdHM4-pCMV-loxP-Neo-EGFPをPacI酵素処理後に293細胞にトランスフェクションし、得られたウイルスブランクを増幅、精製、脱塩して、目的の第1の組換えDNAを含むアデノウイルスベクターAd.CA-loxP-Neo-EGFP、Ad.CMV-loxP-Neo-EGFPを得た。実施例1でも述べたように、本実施例の目的には、CAプロモーターでもCMVプロモーターでも本質的な差はないが、より発現が強いということで以下には、Ad.CA-loxP-Neo-EGFPを用いた実験結果を示す。但し、Ad.CMV-loxP-Neo-EGFPでも同様の実験を行い、同様の結果が得られることは確認されている。

【0058】

全く遺伝子が導入されていないES細胞(D3)を用い、実施例1と同様に、LIFを除いた培地でembryoid bodyを作成することで分化誘導を行った。まずNkx2.5を指標とした、ES細胞由来のより未分化な心筋細胞の単離には、4日目にAd.Nkx2.5-CreとAd.CA-loxP-Neo-EGFPの2つのアデノウイルスベクターをそれぞれ30 MOIで感染させ、6日目にセルソーターで目的のEGFP発現細胞を単離した。つまり本実施例が実施例1と異なるのは第1の組換えDNAをアデノウイルスベクターを使って遺伝子導入したことのみである。この実験の結果、実施例1と同様の細胞が単離され、これらの細胞は実施例1と同様の遺伝子の発現パターンを示した。

【0059】

次に α MHC遺伝子を発現するES細胞由来の成熟心筋細胞の単離には、実施例2と同様に分化誘導第9日目に、Ad. α MHC-CreとAd.CA-loxP-Neo-EGFPの2つのアデノウイルスベクターをそれぞれ30 MOIで感染させ、第13日目にセルソーターで目的のEGFP発現細胞を単離した。この実験結果も、実験2と同様の細胞が単離され、これらの細胞は同様の心筋特徴的な遺伝子の発現パターンや心筋細胞様の収縮を示した。

この2つの実験結果より、第1の組換えDNAも第2の組換えDNAもアデノウイルスを使って遺伝子導入することで、従来の遺伝子導入安定発現細胞を取って行う方法と同様の結果が、より簡単に得られることが確認できた。

【0060】

実施例1及び実施例2で示したように、従来の技術で第1の組換えDNAを安定発現するES細胞を作成し、良好なクローンを選んでおいて、これに第2の組換えDNAをアデノウイルスで遺伝子導入するという方法と、実施例3のように両方のDNAをアデノウイルスを使って遺伝子導入する方法は、いずれも本発明における意義において本質的な差はない一方、それぞれの利点は目的によって使い分けが有用と考えられる。二つのDNAの遺伝子導入にアデノウイルスベクターを用いる利点をまとめると以下ようになる。

(1) 第1、第2の組換えDNAが安定導入され恒常発現するクローンを取る煩わしい作業の労力、時間を必要としない：つまり実施例1、2で示したように、従来の方法で第1の組換えDNAを導入し安定的に恒常発現するクローンを選んで取るには、労力も時間も必要とする。さらに全くアデノウイルスベクターを使用せず従来の技術だけで遺伝子導入して、第1と第2の組換えDNAの両方を安定的に恒常発現するクローンを選んで取るとすると、さらなる時間と労力を要することになる。この場合それに加え、2種類の異なる薬剤耐性遺伝子を必要とすることになり、これらの多重薬剤耐性遺伝子発現、またそのクローンを選択する煩雑な作業や長期の薬剤使用によるES細胞への影響、つまり細胞の性格の変化など、問題となる可能性があり、またこのような種々の影響で目的のクローンがとれない場合さえもある。

(2) アデノウイルスベクターは分化段階の任意な時期に高率に簡単に目的遺伝子を導入できる：これは従来の技術では不可能なことであったが、アデノウイルスを使えば簡単にできることを、本発明で示した。この利点として、(1)で記載したこととも関連するが、ES細胞に不要な遺伝子や薬剤の長期間の暴露などの、不要な影響を与えない。

(3) アデノウイルスベクターは、宿主細胞（この場合ES細胞）に導入遺伝子をepisomal（染色体に組み込まれることなく核内に存在）の形で安定して長期間

発現させるため、安定した結果が得られる：従来の方法で、染色体に目的の遺伝子が組み込まれたES細胞クローンを薬剤耐性遺伝子を利用して取って来る方法の場合、これらの導入遺伝子が染色体にランダムに組み込まれるため染色体上で組み込まれた場所の影響、クロマチン構造の影響などを受ける。このため必ずしも組み込まれた遺伝子が全て安定して発現するわけではないため、(1)に記載したように導入遺伝子を安定発現する良好なクローンを選択してくるのに時間と労力を要する。さらにES細胞では、他の癌細胞株や初代正常培養細胞などを用いた場合に比べ、染色体に組み込まれた導入遺伝子の発現が不安定になりやすいこと、例えば導入遺伝子の発現がシャットオフされる場合もあることが知られている。これに対しアデノウイルスベクターで遺伝子を導入した場合、episomalであるため、このような染色体やクロマチンの影響をうけにくく、安定した発現が得られ、再現性のある安定した結果がいつも得られる。

(4) 任意のES細胞株を用いることができる：ES細胞株の種類、またそのクローンやサブクローンによって分化能、性格が異なっている。この場合、ある細胞の単離には、よりその細胞へ分化しやすいことが同定されているES細胞株のクローンを特に指定して使用したい場合が考えられる。実施例3の第1と第2の組換えDNAを遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを用いれば、それぞれのES細胞株やクローンについて安定細胞株を作成する必要がなく、自由に望みのES細胞を使用して行うことができる。

(5) ES細胞以外にも簡単に遺伝子導入できるため、作製した第1の組換えDNAの特異性を他の細胞で直接的に確認することができる。また他の細胞での実験へも、この遺伝子構築したものが簡単に応用できる。

【0061】

前述したように、実施例で使用したNkx2.5遺伝子プロモーター及び α MHC遺伝子プロモーターの特異性は既に確認されており、また実際の実験結果でも心筋細胞を単離できることは明らかとなったが、さらに(5)の観点から、実施例3の二つのアデノウイルスで導入したDNAが正しく目的の心筋細胞を特異的に可視化できていることを直接的に証明する目的で、この二つのアデノウイルスをマウスの初代心筋培養細胞に感染させてみた。

【0062】

出生1日目の新生児マウスより心筋を取り出し、これをコラゲナーゼで消化して心筋細胞を単一細胞に分離した後、培養皿に巻いて培養した。この初代心筋細胞培養の手技は、Khalid MA et al. Circ. Res. 72, p725-736 (1993)、ならびにWang L et al. Circ. Res. 79, p79-85 (1996) に記載された方法に基本的に従って行った。このように培養して2日目の心筋細胞に、Ad.Nkx2.5-CreとAd.CA-loxP-Neo-EGFPをそれぞれ5MOIで感染させて、感染72時間後に蛍光顕微鏡下で観察したところ、遺伝子が導入された心筋細胞がEGFP陽性として可視された。同様のプロトコールで、Ad. α MHC-CreとAd.CA-loxP-Neo-EGFPを同じように感染させても、遺伝子導入された心筋細胞はEGFP陽性として可視された。これらの二つのアデノウイルスベクターを他の心筋以外の数種類の培養細胞 (Helaヒト子宮頸癌細胞、MKN28ヒト胃癌細胞、LL2マウス肺癌細胞、LM8マウス骨肉腫細胞など) に感染させて、その特異性を検証したが、いずれの細胞でもこのようなEGFPの発現は蛍光顕微鏡でみられなかった。このように実施例1、2、3で用いた第1の組換えDNAと第2の組換えDNAは、遺伝子導入されると明らかに心筋細胞のみを標的化してEGFPで可視化できていることが直接的に証明された。

【0063】

【発明の効果】 本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法により、ES細胞から分化するいかなる目的細胞も、用いるプロモーターの組織特異性のみに依存して、容易に可視化でき、フローサイトメトリーなどにより簡便に、迅速に、確実に、選別し、単離することができる。

また、胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的な単離は、単離用キットを用いることにより一層簡便に行うことができる。

本発明の目的細胞の選別的単離方法及びこれにより単離される各種の細胞、組織は、発生学、再生医学、その他の分子生物学的研究に広く有用であるだけでなく、これらの目的細胞を用いた、心筋梗塞、脳硬塞を初めとする種々の難治性疾患への将来の再生医療の開発にも非常に有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法を模式的

に示す説明図である。

【図2】 アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を示す蛍光顕微鏡写真像及びグラフである。

(a) フィーダー細胞上で培養したマウスES細胞 (R1細胞) の蛍光顕微鏡写真像。

(b) フィーダー細胞無しで培養したマウスES細胞 (D3細胞) の蛍光顕微鏡写真像。

(c) 分化誘導中のマウスES細胞 (D3細胞) の蛍光顕微鏡写真像。

(d) 各MOIでアデノウイルスベクターによるES細胞 (R1細胞) の遺伝子導入効率を示すグラフ。

(e) 各MOIでアデノウイルスベクターによるES細胞 (D3細胞) の遺伝子導入効率を示すグラフ。

なお、(a) ~ (c) は、MOI100でAd. CMV-LacZを感染させ、x-gal染色したものであり、右上はその位相差顕微鏡写真像を示す。

【図3】 本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法によりEGFPで可視化されたES細胞の蛍光顕微鏡写真像である。

(a) 陰性コントロールとして、Ad. CMV-LacZを感染させたもので、EGFPの発現はない。

(b) 陽性コントロールとして、Ad. CA-LacZを感染させたもので、遺伝子導入効率に一致して、60~70%位の細胞がEGFPの発現により可視化されている。

(c) Ad. Nkx2.5-Creを第4日に感染させ、第6日に観察したもので、目的細胞と思われる細胞が散在して可視化されている。

(d) Ad. α MHC-Creを第13日に観察したもので、目的細胞と思われる細胞が可視化されている。

【図4】 Ad. CMV-LacZ、Ad. Nkx2.5-Cre及びAd. α MHC-Creの発現を指標に単離された細胞のフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡写真像である。

(a) フローサイトメトリーの結果を示すチャート。

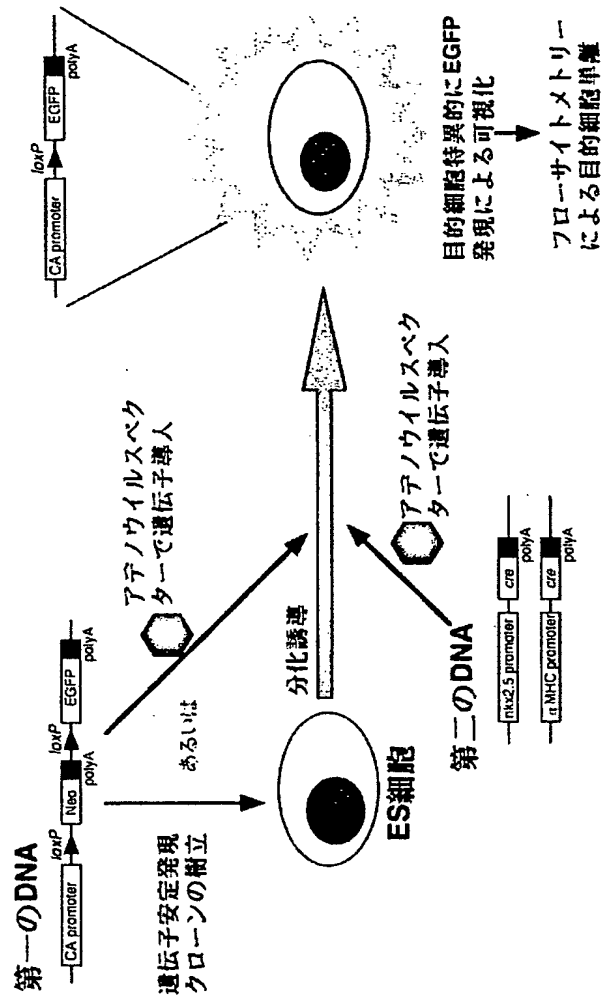
(b) Nkx2.5を指標に単離された細胞の免疫細胞染色の蛍光顕微鏡写真像である。具体的には、(左図) がEGFP、(中図) が目的の蛋白の発現を示しており、

上段はSMA、下段はトロポミオシンで、それぞれに対する特異的な抗体により免疫蛍光染色したものである。また、(右図)は(左図)と(中図)を重ね合わせた写真像で、EGFPと目的の蛋白が同じ細胞で発現していることを示している。

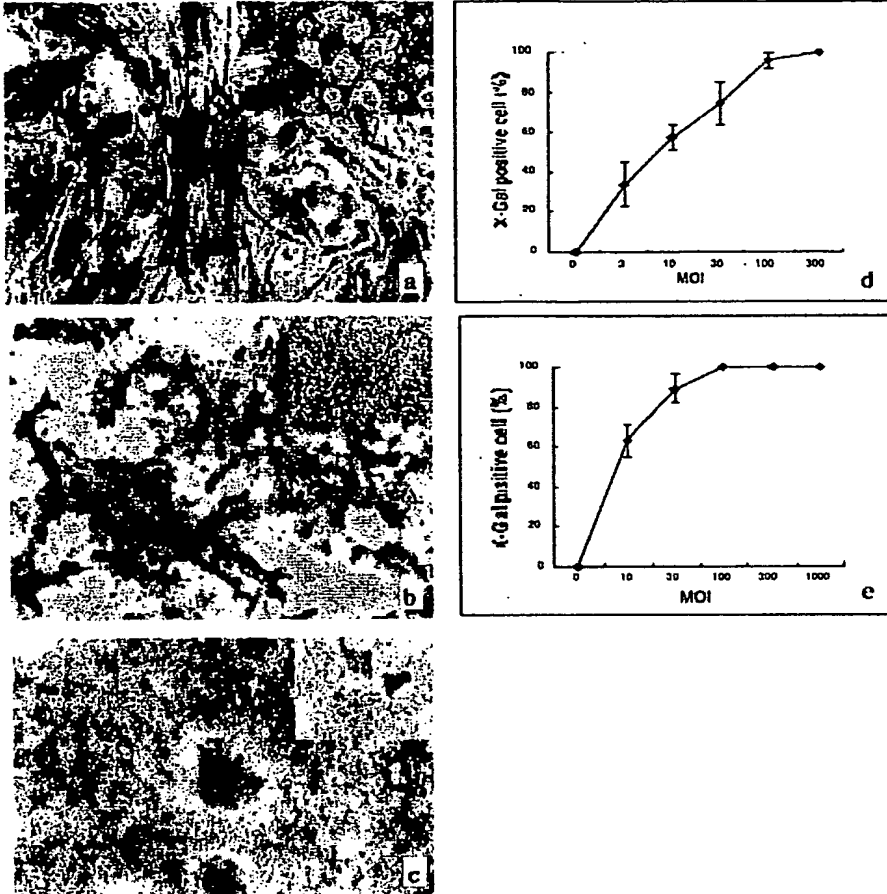
(c) α MHCを指標に単離された細胞の免疫細胞染色の蛍光顕微鏡写真像である。具体的には、(左図)がEGFP、(中図)が目的の蛋白の発現を示しており、上段は α MHC、下段はアクチニンで(いずれも心筋細胞特異的な分子)、それぞれに対する特異的な抗体により免疫蛍光染色したものである。また、(右図)は(左図)と(中図)を重ね合わせた写真像で、EGFPと目的の蛋白が同じ細胞で発現していることを示している。

【書類名】図面

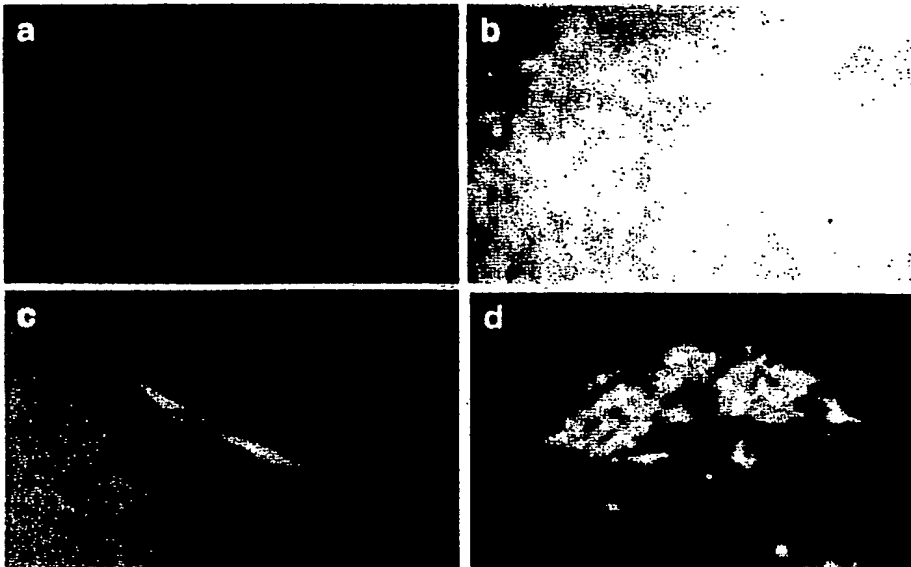
【図1】



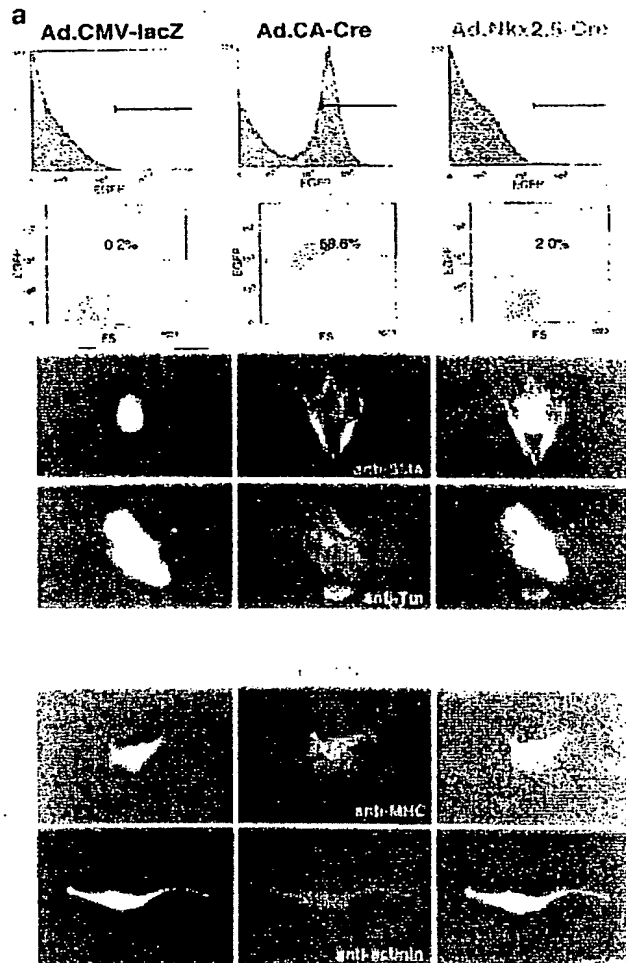
【図 2】



【図3】



【図 4】



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 活性（発現強度）が低い組織特異的なプロモーターでもマーカー遺伝子を機能させるために十分な量の発現を可能とすることにより、再生医療や発生学の研究などで有用な各種動物のES細胞から分化した目的細胞を確実、簡便かつ迅速に選別単離する方法及びそれに用いる単離用キットを提供すること。

【解決手段】 第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に5'側から配置され、第1のプロモーターが前記選択マーカー遺伝子を発現させる第1の組換えDNAと、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に5'から配置された第2の組換えDNAとを、各々胚性幹細胞に導入することを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法。

【選択図】 図1

特願2002-175231

出願人履歴情報

識別番号

[598091860]

1. 変更年月日
[変更理由]

1998年 7月 9日

新規登録

住 所
氏 名

愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号
財団法人名古屋産業科学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.